

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平6-506056

第6部門第1区分

(43) 公表日 平成6年(1994)7月7日

(51) Int.Cl. ³	識別記号	庁内整理番号	F I
G 0 1 N 33/53	V	8310-2 J	
C 0 7 K 17/00		8318-4 H	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 13 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平4-505164</p> <p>(86) (22) 出願日 平成3年(1991)10月30日</p> <p>(85) 翻訳文提出日 平成5年(1993)4月30日</p> <p>(86) 国際出願番号 PCT/US91/08080</p> <p>(87) 国際公開番号 WO92/07952</p> <p>(87) 国際公開日 平成4年(1992)5月14日</p> <p>(31) 優先権主張番号 605, 647</p> <p>(32) 優先日 1990年10月30日</p> <p>(33) 優先権主張国 米国 (US)</p> <p>(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, NL, S E), AU, CA, J P</p>	<p>(71) 出願人 イミュロジック ファーマシューティカル コーポレーション アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02154 ワルサム, リンカーン ストリー ト 610</p> <p>(71) 出願人 マーク アンド カンパニー, インコーポ レイテッド アメリカ合衆国 ニュージャージー 07065 ラーウェイ, イー, リンカーン アベニュー 126</p> <p>(74) 代理人 弁理士 山本 秀策</p>
--	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 MHC抗原によるペプチド結合検定法

(57) 【要約】

本発明は、MHC糖タンパク質に対する小分子量の生体分子およびペプチドの親和性を測定する迅速かつ効率的で正確な検定法を提供するものである。本発明の方法は、溶液状態もしくは固体支持体にカップリングされたMHC糖タンパク質に対する、検出可能なアゴニストと目的の候補体間の競合反応を使用し、次いで、MHC糖タンパク質とアゴニストとの複合体形成を検出する方法である。MHC糖タンパク質は、検定法を最適化するために、第2アゴニストで前負荷し得る。あるいは、本発明の方法は、MHC糖タンパク質から、前負荷されかつ標識されたペプチドの、目的の候補体による置換を使用する。複合体中のアゴニストの濃度は、感作されたT細胞の増殖に対する複合体の作用によって測定し得る。

請求の範囲

1. MHC糖タンパク質に対する試験化合物の親和性を測定する方法であって、

反応混合物中に、細胞を含有しない分散されたMHC糖タンパク質、該MHC糖タンパク質に結合して複合体を形成し得かつ該複合体中にあるとき検出し得るアゴニスト、および該試験化合物を、

該試験化合物と該アゴニストが競合して該MHC糖タンパク質と結合する条件下で混合する工程；

MHC糖タンパク質に捕捉されたアゴニストを未結合のアゴニストから分離する工程；および

該複合体中に結合しているアゴニストの量を、反応混合物中の試験化合物の濃度の関数として検出する工程を包含する、方法。

2. 前記MHC糖タンパク質が、完全な質膜配列を欠く、請求項1に記載の方法。

3. 前記分離工程が、ゲル濾過法による、請求項1に記載の方法。

4. 前記反応混合物が、約4.5から8の範囲のpHで、そして約0.1から2%の非イオン界面活性剤を含有する、請求項1に記載の方法。

5. 前記アゴニストが、ビオチンにカップリングされ、そして前記検出工程が、前記MHC複合体が標識を含有するストレプトアビジンと反応する工程により行われる、請求項1に記載の方法。

中の該試験化合物の濃度の関数として検出する工程を包含する、方法。

11. 前記固体支持体が、MHC糖タンパク質に対する親和性リガンドを含有するよう改変された、請求項10に記載の方法。

12. 前記親和性リガンドが、MHC糖タンパク質に対して特異的な抗体あるいは免疫学的に反応性のそのフラグメントである、請求項11に記載の方法。

13. 前記アゴニストがビオチンにカップリングされ、および前記検出工程が、前記MHC複合体が標識を有するストレプトアビジンと反応することによって行われる、請求項10に記載の方法。

14. 前記標識が、蛍光、放射活性または酵素標識である、請求項13に記載の方法。

15. MHC糖タンパク質に対する試験化合物の親和性を測定する方法であって、第1アゴニストを前負荷されたMHC糖タンパク質を、

該試験化合物、および該MHC糖タンパク質と結合して複合体を形成し得かつ該複合体中にあるときに検出し得る第2アゴニストを含有する反応混合物により、

該試験化合物および第2アゴニストが競合して該MHC糖タンパク質と結合する条件下で処理する工程；

該MHC糖タンパク質が、第1前負荷するアゴニストで前負荷される工程；および

載の方法。

6. 前記標識が、蛍光、放射活性または酵素標識である、請求項5に記載の方法。

7. 前記分離工程が、前記複合体を固体支持体にカップリングすることにより行われ、前記固体支持体が、前記MHC複合体に対する親和性リガンドにカップリングされている、請求項1に記載の方法。

8. 前記親和性リガンドが、MHC糖タンパク質に対して特異的な抗体または免疫学的に反応性のそのフラグメントである、請求項7に記載の方法。

9. 前記アゴニストがビオチンにカップリングし、および前記検出工程が、前記MHC複合体が標識を含有するストレプトアビジンと反応することによって行われる、請求項7に記載の方法。

10. 特定のMHC糖タンパク質に対する試験化合物の親和性を測定する方法であって、

MHC糖タンパク質がカップリングされている固体支持体を、MHC糖タンパク質に結合して複合体を形成し得かつその複合体中にあるときに検出され得るアゴニスト、および該試験化合物を含有する、反応混合物によって、

該試験化合物およびアゴニストが競合してMHC糖タンパク質と結合する条件下で処理する工程；

該反応混合物を該固体支持体から除去する工程；および
該固体支持体に結合したアゴニストの量を、該反応混合物

該複合体中に結合された第2アゴニストの量を、反応混合物中の試験化合物の濃度の関数として検出する工程を包含する、方法。

16. 前記第2アゴニストがビオチンにカップリングされ、および前記検出工程が、前記MHC複合体が標識を有するストレプトアビジンと反応することによって行われる、請求項15に記載の方法。

17. 前記標識が、蛍光、放射活性または酵素標識である、請求項16に記載の方法。

18. 前記前負荷されたMHC糖タンパク質が、前記反応混合物を、前記前負荷された糖タンパク質に添加する前に希釈される、請求項15に記載の方法。

19. MHC糖タンパク質に対する試験化合物の親和性を測定する方法であって、該MHC糖タンパク質を、該試験化合物を添加しながら置換可能な標識されたアゴニストで前負荷する工程、および

該試験化合物で置換された標識されたアゴニストの量を検出工程を包含する、方法。

20. MHC糖タンパク質複合体中に含有されている部分の存在もしくは濃度を、該部分で測定する方法であって、該複合体を、該部分で感作されたT細胞と接触する工程、および
該T細胞の増殖の程度を測定する工程を包含する、方法。

21. 前記検出工程が、前記複合体を、前記アゴニストで感作されたT細胞と接触させ、そして前記T細胞の増殖の程

度を測定することによって行われる。請求項1に記載の方法。

22. 前記検出工程が、前記複合体を、前記アゴニストで感作されたT細胞と接触させ、そして前記T細胞の増殖の程度を測定することによって行われる。請求項10に記載の方法。

23. 前記検出工程が、前記複合体を、前記第2アゴニストで感作されたT細胞と接触させ、そして前記T細胞の増殖の程度を測定することによって行われる。請求項15に記載の方法。

的分子量の低い部分となる特異的レパートリーのみを有する。以下に述べる本発明は、この低分子重量部分のレパートリーの固定に関する。

MHC糖タンパク質ペプチド複合体はT細胞レセプターに提示されるが、T細胞レセプターは、自身が結合されるMHC糖タンパク質と協同して、フラグメントを特異的に認識する。その結果、T細胞が刺激されてリンホカインを分泌し、そのためリンパ球が拡大する。

これらのフラグメントはリンパ球の活性化に不可欠のものであるので、特定のリンパ球の活性化を増大もしくは減少させる役割を演ずるペプチドもしくは低分子量の生体分子が作り出され得るかまたは発見され得る。このようにBリンパ球およびTリンパ球の活性化は制御されて、特定の免疫応答を促進するもしくは抑制する。よって、リンパ球の応答を活性化もしくは阻害する有効候補体部分を同定できることは非常に重要であり、これらの同定部分は、自己免疫疾患、感染症、アレルギーなどの治療に有用となり得る。したがって、問題の特定のMHC糖タンパク質を捕捉可能な部分が決定されると、関連MHC糖タンパク質が抗原部分を提示することにより媒介される症状に有用な治療用化合物が提供される。

通常の競合結合検定法は、適切な候補体部分を同定することには適切でないとと思われる。より一般的ナリガンド/レセプターの結合とは異なり、部分/MHC糖タンパク質複合体の生成速度は非常に遅いが、生成した複合体は安定である。その

技術分野

本発明は、特定の主要組織適合性遺伝子複合体の糖タンパク質に結合する候補体部分の性能を測定する方法に関する。有効な候補体は、特定のMHC糖タンパク質で媒介される症状の治療剤として有用である。

発明の背景

免疫系は哺乳類の種の安寧のために必須の器官であるので、免疫系がどのように作動しているのかを理解しようとする熱心な研究が行われている。ごく最近になって、主要組織適合性遺伝子複合体(MHC)の糖タンパク質が、Bリンパ球とTリンパ球の応答に必須の役割を演じていることが決定された。MHC糖タンパク質は、2つのタイプすなわちクラスIとクラスIIに分類されるが、それぞれのクラスにおいて、かなり異なる役割を演じていると思われる。加えて、クラスIとクラスIIの糖タンパク質の構造は異なっている。構造が異なっているにもかかわらず、各々の場合に、免疫系が応答する抗原は細胞内で分解され、その抗原のフラグメントは、MHC糖タンパク質と結合した細胞表面で発現されることが分かっている。MHC糖タンパク質は多型性領域を有し、その領域の溝と関連し、かつ溝に結合するペプチドに対してある程度の特異性を有する。したがって各MHC糖タンパク質は、それが結合できる比較

結果、未変性の物質から得られるMHC糖タンパク質は、内因性ペプチドの不均一な配列と複合するので、速度が非常に遅いときと変動するときを除いて、他の候補体部分と結合することを阻害される。単離されたMHC糖タンパク質の約1%だけが他の候補的な部分を直接捕捉できる"オープン形(open form)"であり、該製剤の約99%はすでに内因性ペプチドと複合していると確定される。

したがって、特定のMHC糖タンパク質に対して多数の候補体部分を、迅速かつ効率的な手法でスクリーニングすることができると有効なリガンド結合検定法を考案する必要がある。本発明は上記の目的を達成するためのいくつかのプロトコルを提供するものである。

関連文献

以下の文献が関連していると考えられる。すなわち、Babbittら、"The Binding of Immunogenic Peptides to Ia Histocompatibility Molecules", *Nature*, 317巻, 359-361頁, 1985年; Buus, "Isolation and Characterization of Antigen-Ia Complexes in T-cell Recognition", *Cell*, 47巻, 1071-1077頁, 1985年; Watts および McConnell, "High Affinity Fluorescent Peptide Binding to I-A^b in Lipid Membranes", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83巻, 9660-9664頁, 1986年; Buschら "Degenerate Binding of Immunogenic Peptides to HLA-DR Proteins on B-cell Surfaces", *Int. Immunol.*, 2巻, 443-447頁, 1990年; Roche および Cresswell,

"High Affinity Binding of an influenza Hemagglutinin-derived Peptide to Purified HLA-DR". *J. Immunol.* 144巻、1849~1856頁、1990年; ChenおよびParham, "Direct Binding of Influenza Peptides to Class I HLA Molecules". *Nature* . 337巻、743-745頁、1989年; およびBouilliotら, "Physical Association Between MHC Class I Molecules and Immunogenic Peptides". *Nature*, 333巻、473~475頁、1989年である。

発明の開示

本発明が提供する第1のプロトコルは次のとおりである。分散された可溶性MHCタンパク質を、検出可能なアゴニストがMHCタンパク質と複合体を形成することが分かっている条件下で、競合候補体部分の存在下において、該検出可能なアゴニストで処理する。生成した複合体を反応混合物から分離し、複合体中に含有されているアゴニストに対する候補体部分の作用を測定する。

本発明の第2のプロトコルは、例えば精製されたMHCタンパク質が容易に入手できない場合に特に適しているが、以下のとおりである。MHCタンパク質を検定プレートに捕捉させて、可溶性MHCの代わりに競合検定法に用いる。この検定プレートは、例えば、抗-MHCタンパク質抗体またはMHCタンパク質に対して親和性を有する他の試薬に誘導体化されている。やはり、固定化MHCの検出可能なアゴニストとの結合に対する候補体部分の作用を測定する。

Cタンパク質、前記Cタンパク質に結合して複合体を形成し、かつその複合体中にあるとき検出することができる可溶性アゴニスト、および試験化合物を、試験化合物とアゴニストが結合してMHCタンパク質に結合する条件下で混合する工程; MHCタンパク質に捕捉されたアゴニストを未結合のアゴニストから分離する工程; および、複合体中に結合されているアゴニストの量を、反応混合物中の試験化合物の濃度の関数として検出する工程; を包含する。

第2の態様において、本発明は、特定のMHCタンパク質に対する試験化合物の親和性を測定する方法に関するものであって、該方法は、MHCタンパク質が結合されている固体支持体を、MHCタンパク質と結合して複合体を形成し、かつその複合体中にあるときは検出することができる可溶性アゴニスト、および試験化合物を含有する反応混合物で、試験化合物と前記アゴニストが結合してMHCタンパク質に結合する条件下で、処理する工程; 前記反応混合物を固体支持体から取り出す工程; および、前記固体支持体に結合したアゴニストの量を、反応混合物中の試験化合物の濃度の関数として検出する工程; を包含する。

第3の態様において、本発明は、MHCタンパク質に対する試験化合物の親和性を測定する方法に関するものであって、該方法は、第1アゴニストを前負荷されたMHCタンパク質を、前記MHCタンパク質と結合して複合体を形成し、かつ前記複合体中にあるときは検出することができる第2アゴニスト、

他のプロトコルでは、単離されたMHCタンパク質は、均一なペプチド製剤が前負荷され、その結果、すでにカップリングされたMHCタンパク質の均一な集団が提供される。前負荷されたペプチドの解離反応が、別の候補体部分の結合反応の律速段階である場合、この方法は、反応速度を制御して、検出可能なアゴニストと候補体間の均一な競合を保証することができる。さらに、生成したMHC複合体を希釈すると、前負荷されたペプチドの解離が速くなり、そのため、アゴニストもしくは候補体に結合する"中空ポケット (empty pocket)" (すなわち利用可能なドメインまたは結合部位) を生成する。均一な前負荷されたペプチドとしては、MHCタンパク質によって比較的容易に放出され、したがって検定に要する時間が短くなるものを選択することが好ましい。

その他のプロトコルでは、単離されたMHCタンパク質に、このタンパク質からの解離速度が他のペプチドの存在によって影響されることが分かっている標識ペプチドを前負荷する。そして、MHCタンパク質からの標識アゴニストの解離もしくは置換の反応を加速する試験化合物の性能を測定する。

さらに、アゴニストおよび/または候補体部分との複合体の形成を検出するのに有用な手段は、T細胞刺激に対する複合体の作用を測定することである。

したがって、1つの態様において、本発明は、MHCタンパク質に対する試験化合物の親和性を測定する方法に関するものであって、該方法は、反応混合物中に、セルフリー分散MHC

および試験化合物を含有する反応混合物で、試験化合物と第2アゴニストが競合してMHCタンパク質と結合する条件下で、処理する工程; 前記MHCタンパク質は、該反応混合物を添加する前に前負荷するアゴニストで前負荷され、かつ希釈される工程; および、複合体に結合される第2アゴニストの量を、反応混合物中の試験化合物の濃度の関数として検出する工程; を包含する。

第4の態様において (解離速度検定法)、本発明は、MHCタンパク質に対する試験化合物の親和性を測定する方法に関するものであって、該方法は、反応混合物中に、標識アゴニストを前負荷されたMHCタンパク質、および試験化合物を混合する工程であり、前記の前負荷された複合体の解離速度は他のペプチドの存在によって影響されることはわかっているもの; および、試験化合物が存在するときと存在しないときとの上記の前負荷された複合体の解離速度を比較して、試験化合物によって加速されたオフ速度 (off rate) を検出する工程; を包含する。

第5の態様において、本発明は、MHCタンパク質複合体中の (候補体) 部分の存在を検出する方法に関するものであって、該方法は、前記複合体を前記部分で感作されたT細胞の培養物と接触させて、前記T細胞の存在、不在、または増殖量を検出する工程を包含する。

図面の簡単な説明

図1は、DR4Dv4との結合について、未標識RA307-819が標識

HA307-319と競合的であることを示す代表的阻害曲線である。

図2は、粗溶解物から、抗体でコートされた微量滴定プレートによって捕捉されたDR4Dv4を用いる、標識HA307-319の結合曲線を示す。

図3A、3Bおよび3Cは、DR4Dv4 MHC糖タンパク質に前負荷した後、種々の試験ペプチドについて測定した“オフ速度”を示す。

図4Aと4Bはそれぞれ、前負荷されたMHC糖タンパク質および対照MHC糖タンパク質に対するRMBP90-102ペプチドの結合曲線と阻害曲線を示す。

図5Aと図5Bはそれぞれ、HA307-319が存在しない場合と存在する場合の、ビオチニル化RMBP90-102とビオチニル化HSP3-14の解離曲線を示す。

図6は、ビオチニル化HSP3-14のRMBP90-102による置換曲線を示す。

図7は、捕捉されたペプチドの検定法として、感作T細胞の増殖を用いたHA307-319ペプチドの結合曲線を示す。

発明の実施態様

数種の有効な検定方法を用いて、検出可能なアゴニストと問題の候補体部分との間の競合を利用し、特定のMHC糖タンパク質に対する該候補体の結合を測定する方法および組成物を提供する。

解離速度検定法を除く、本発明のすべての方法では、検出可能なアゴニストと候補体間に競合が行われる。その場合、

ドを測定するT細胞増殖検定法について記載したように、検出がアゴニストの性質にのみ依存した方法で行われる場合は、外来性の標識付けを行う必要はない。したがって、アゴニストは複合体中にあるときは、検出可能であることのみが必要である。

しかし、アゴニストが標識によって検出される場合は、標識は種々の形態をとり得る。したがって、放射性同位元素、ビオチン、蛍光剤、化学蛍光剤などのような種々の標識が用いられ得る。標識の選択は、主として、簡便さ、感度、バックグラウンドの最小化、MHC糖タンパク質に対するアゴニストの結合への干渉の最少化などに基づいて行われる。一般にアゴニストの濃度は、MHC糖タンパク質の濃度の約0.1~50倍である。

特に好ましい標識はビオチンである。ビオチンを“標識”として用いる場合、多量の標識で順に標識付けがなされるストレプトアビジンが検出に用いられ得る。したがって、ストレプトアビジンは、放射性同位元素、蛍光剤、化学蛍光剤、酵素、コロイド粒子などで標識が付けられ得る。どの標識を採用するかは、上記のように種々の検討を行って決定される。

問題の候補体部分の濃度は、媒体中に存在するアゴニストの濃度、および候補体とアゴニストの相対親和性によって変化する。通常、候補体の量は、媒体中に存在するアゴニストの量とは、約100倍以上まで異なることはない。

本発明の方法によれば、種々の成分（例えば、MHC糖タンパ

少なくとも1つの濃度および好ましくは種々の濃度の候補体部分の、検出可能なアゴニストの結合に対する作用が測定される。

解離速度検定法では、前負荷されたMHC/標識アゴニスト複合体の解離速度に対する、少なくとも1つの濃度および好ましくは種々の濃度の候補体部分の作用が測定される。

検出可能な“アゴニスト”とは、試験される特定のMHC糖タンパク質に結合できることがわかっているペプチドなどの低分子量化合物を意味する。DR対立遺伝子に対して有用なアゴニストとしては、例えば307-319の位置で表されるような赤血球凝集素由来のペプチド(HA307-319) (*Int Immunol*, 2巻, 443頁, 1990年)がある。DR対立遺伝子のMHC糖タンパク質産物を捕捉することが分かった他の有用なアゴニストには、限定はないが、HADP 3.2, RRFAAAYAARAAA; HADP 3.6, RRFAAQYAA RAAA; RMBP 90-102, HFFKNIVTPRTPA; HSP 3-14 (R5 K19), RYRRGLTYAVKG; HSP 3-14 (K5 K13), RYKRLTYAVKG; HSP 3-14 (K5 A13), RYKRLTYAVAG およびこれらを短くした変形体が含まれる。有効なアゴニストとしては、上記ペプチドおよびそのアミノとカルボキシルの電荷が放出された等価物が含まれる。いくつかのアゴニストは、百日咳毒素31-43、ブタクサ350-62、およびインフルエンザ・マトリックス18-30のように対立遺伝子特異的である。

アゴニストには一般に、MHCと複合したとき容易に検出できるような方式で標識が付けられる。しかし、複合したペプチ

ク質、アゴニストおよび試験化合物)を混合し、混合物が平衡状態に達するまで十分な時間静置しておく。一般に温度は約37℃である。通常、平衡に達する時間は少なくとも約0.5時間、より一般には約12時間であり、一般に約48時間を超えない。速度測定を利用することができ、複数の試料が用いられ、かつ各試料が複合体の生成量について分析される場合、通常は候補体の濃度を変えて一回測定するだけでよい。

適切な候補体部分としては、問題のMHC糖タンパク質をブロックすると考えられる低分子量の物質が含まれる。一般に、これらの候補体は、アミノ酸が5以上のオーダーのペプチドまたはこのようなペプチドのコンホメーションを模倣する低分子量の生体分子である。広範囲にわたる候補体が、現在活動している合理的な医薬設計の分野で広く知られている。候補体の範囲に理論的制限はないので、活性であると推定されるいずれの化合物も採用され得る。

1つの方法では、溶解状態の可溶性MHC糖タンパク質が複合体生成反応に使用される。MHC糖タンパク質と複合した標識アゴニストが遊離アゴニストから分離され、次いで、複合したアゴニストの量が、候補体のMHC糖タンパク質に対する親和性の尺度として測定される。この方法は、多数の候補体をスクリーニングし、MHC可溶性糖タンパク質に対する候補体の親和性に関連する値を得る迅速、簡単かつ正確な技術を提供する。この値は、前記MHC糖タンパク質が細胞膜中のそれらの天然の位置にある場合にみられる親和性に関連があると考えられる

値である。

この方法を実施する際には、MHC糖タンパク質が細胞膜を含有しない天然産の二量体の糖タンパク質であるか、または質膜領域を欠く可溶性糖タンパク質である場合、MHC糖タンパク質の溶液が調製される。可溶性糖タンパク質は種々の方法で調製され得る。クラスIIのMHC糖タンパク質の α 鎖と β 鎖またはクラスIのMHC糖タンパク質の α 鎖をコードする遺伝子が質膜領域の全部または一部を除去することによって端を切り得る場合は、組換え法を用いる。好都合なことには、質膜配列は、脂質に連結できる領域と置換され得る（例えばCarasら、*Science*, 228巻、1280頁、1987年; Tykocinskiら、*Proc Natl Acad Sci USA*, 85巻、3555頁、1988年参照）。その脂質は次に、適切なエステル、例えばホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼCで除去され得る。MHC糖タンパク質の濃度は、一般に約0.01~50 μ Mの範囲内にあり、より一般に約0.1~1 μ Mである。この範囲は利用しやすく、かつ臨界的なものではない。というのは、いくつかの試験では、結合される混合物の親和性、使用される部分の濃度などによって、上記範囲より高いかまたは低い濃度を用いる方が望ましい場合があるからである。

媒体は、一般に約10~200mMの緩衝剤の濃度によって、ほぼ生理的pHの4.5~8、好ましくは約5~6.5に緩衝される。他の添加物は、塩を約10~20mMの濃度で、または非イオン界面活性剤を含有し得る。非イオン界面活性剤は、一般に、約0.1~

2%の濃度で含有される。ペプチドアゴニストを用いる場合そのペプチドは、一般に少なくとも約3つの、多くとも約30までのアミノ酸からなるものであり、好ましくは約3~15のアミノ酸、さらに好ましくは約5~15のアミノ酸からなる。

十分なMHCアゴニスト複合体が形成されたならば、その複合体は種々の方法で分離され得る。その複合体は、ゲル濾過法、非還元性SDSポリアクリルアミド中でのゲル電気泳動法、またはMHC糖タンパク質に対して特異的な抗体もしくは他の親和性試薬（リガンド）でコートしたプレートに複合体を結合させることによって、遊離アゴニストから分離され得る。ゲル分画法（gel fractionation）には、セファデックスG-50が有用であることが知られる。ゲル電気泳動法には、非還元性条件下の12.5% SDS-PAGEゲルが十分であることが知られる。

しかし好ましくはアフィニティ分離法、特に抗体分離法が、好ましくはプレート上で、特に多くのウェルを具備するプレート上で用いられる。例えば、MHC糖タンパク質のサブユニットの1つの定常部に対して特異的な過剰な抗体もしくはそのフラグメントを採用することによって、アゴニストとMHC糖タンパク質との間の複合体を捕捉し得る。次に、非特異的に結合しているかもしくは結合していない標識アゴニストを洗浄して除き、続いて、表面に結合して存在しているアゴニストを検出することによって、表面に結合したアゴニストの量を定量し得る。洗浄は、複合体を生成させるのに用いた媒体を含有する便利な緩衝媒体で実施され得る。アゴニストをビオ

チンで標識をつける場合、標識アビジンを用いることによって、単一のアゴニスト-MHC糖タンパク質複合体に結合された複数の標識が得られ得る。アビジンについて特に重要なのは蛍光標識の使用であり、とりわけランタニド（希土類元素）キレート化合物、さらにとりわけユーロピウムキレート化合物、または酵素、特に西洋ワサビのペーオキシゲナーゼの使用である。これらの標識は通常の手法に従って定量され得、ランタニドキレート化合物からの蛍光を検出する多数の蛍光分析器、および発色団をもたずペーオキシゲナーゼの基質を検出する分光光度計が用いられ得る。

第2の方法は、候補体が、粗溶解物中に存在するMHC糖タンパク質と複合体を形成する性能を測定するのに特に有用であるが、この方法では、問題のMHC糖タンパク質はまず固体支持体に捕捉され、溶解物の残りの成分は支持体に吸着されたMHC糖タンパク質を除いて洗浄される。次に、カップリングされた支持体は、MHC糖タンパク質および競合する候補の部分と複合したときに検出できるアゴニストを含有する反応混合物で処理される。アゴニストの標識の種類と、必要であれば反応混合物中の競合物質の濃度の種類は、可溶性MHC糖タンパク質の使用に関する記載のものと類似している。

誘導体化された固体支持体は、当該技術分野で公知の標準技術によって、問題のMHC糖タンパク質に対して特異的な親和性試薬の受動的吸着または共有結合カップリングにより調製される。一般に、微量滴定プレートまたは他の多数のウェル

を具備する反応マトリックスが固体支持体として使用される。この方法は、候補体および/またはアゴニストのMHC糖タンパク質との結合を妨害することがある夾雑物を粗溶解物から除去するという利点がある。このような夾雑物の活性は最小にしなければならない。というのは、溶解物中に存在するプロテアーゼなどが活性を示す場合、アゴニストのMHC糖タンパク質との結合は高温下でのみ起こるからである。

したがってこの方法では、適切な量のアゴニストおよび候補体を含有する反応混合物は、固体支持体に結合されたMHC複合体の存在下で適切な期間、通常約3~48時間インキュベートされる。インキュベーション期間が終わってから、固体支持体を反応混合物から取り出し、洗浄し、そしてMHC糖タンパク質に結合したアゴニストは上記の標識の性能によって測定される。

第3の方法では、第1の競合プロトコルが用いられ得るが、MHC糖タンパク質を、均一な通常ペプチドアゴニストで前負荷することによってさらに最適化され得る。この方法は、アゴニスト/競合体の組み合わせの結合を行うことができる適切なオフ速度を有する。この方法では、精製MHC糖タンパク質もしくは粗溶解物が、前負荷するアゴニストとともにインキュベートされる。一般にオクテルグルコシドを含有する適切な緩衝液中で、未変性MHC糖タンパク質中に含有される不均一な内因性ペプチドを、前負荷する均一な部分で置換するのに充分な時間、一般には一晚インキュベートされる。前負荷されたMHC複合体は次に希釈されて、上記の検定系に用いられる。

この方法は、アゴニストもしくは候補体と結合もしくはカップリングを行う“中空”MHC糖タンパク質結合ドメインを均一に提供する。一般に候補体またはアゴニストの結合反応の律速段階を他の方法でも促進すると、検定時間が短くなり、候補体の結合速度と親和性をより正確に測定し得る。入ってくるアゴニストもしくは候補体は前負荷された部分を返出すことが不必要な場合は、前負荷条件を与えることによって、負荷されていないMHC糖タンパク質に対する競合体の親和性はより容易に比較され得る。MHC分子は、既知の解離速度を有するペプチドで前負荷されるので、検定は、より短い時間で好ましくは3時間で実施され得る。

第4の方法では、MHC糖タンパク質は、他のペプチドの存在下で置換されることが実証されている、均一な標識ペプチドアゴニストで前負荷される。この方法では、精製されたMHC糖タンパク質は標識アゴニストとともにインキュベートされる。一般にオクテリグルコシドを含有する適切な緩衝液中で、不均一な内因性ペプチドを、前負荷する部分で置換するのに充分な時間、一般には一晩インキュベートされる。前負荷されたMHC複合体は次に、置換する候補的部分の溶液で約0.5時間希釈し、次に、候補的部分がある場合およびない場合のカウントの喪失を上記のようにして監視する。

本発明の別の態様では、競合検定法に用いられるアゴニストに標識を付ける必要がない。この方法では、複合体は、感作されたT細胞とともにT細胞増殖検定法で用いられる。感

作されたT細胞の増殖促進は、複合体に対するアゴニストの結合の尺度である。またこの方法は、T細胞を試験部分で感作することによって、複合体内のいずれの試験部分ともの検出に用いられ得る。

以下の実施例は例示を目的として提供するものであって本発明を限定するものではない。

実施例1

HLA-DRおよびDQ糖タンパク質の精製

抗DR(LB3.1)および抗DQ(1VD12)のアフィニティーカラムを、球形セルロース樹脂(Amicon)および上記の各抗体40mgずつで調製した。カラムに結合する可溶性クラスIIの最大量は、結合された抗体のモル濃度の2倍である。よって、40mgの免疫グロブリンは、多くてもクラスIIのMHC糖タンパク質の32mgしか捕捉できない。実際には、アフィニティーカラムの理論的容量の10~30%しか結合できず、これはDRとDQの3~9mgに相当する。L243とLB3.1のカラムの比較を、 1.8×10^{10} の細胞のNP-40界面活性剤による抽出物を等しく分割して各カラムに負荷し、pH11.5の緩衝液に5分間または15分間さらして溶離することによって実施した。収量は次のとおりである。

(以下余白)

	5'露出 (mg)	15'露出 (mg)	全収率 (mg) (mg)	
L243	1.8	0.886	2.69	
LB3.1	2.10	2.02	4.12	6.81
1VD12	1.37	3.21	4.58	4.58

*BSAを標準として用いたBCA検出法により測定した。

(以下余白)

実施例2

ゲル濾過による放射性ペプチド-MHC

複合体の遊離ペプチドからの分離

ヨウ素化されたHA307-319アナログ(2μM)を、HLA-DR4Dw4(2μM)とともにPBS/1%オクテリグルコシド中で一晩インキュベートした(合計容積は50μL)。反応混合物を25mlのセファデックスG-50カラムに加えた。画分(0.5ml)をPBS/1%オクテリグルコシドに溶離し、計数した。放射能標識をつけたペプチドの溶離図も決定した。ペプチドを含有しない複合体に起因していると考えられるピークが、約40~50%相対溶出量%に観察された。このピークはペプチド制御がなされた場合には認められなかった。

実施例3

抗体をコートしたプレートを用いて行う

捕捉物の遊離ペプチドからの分離

a) 放射性ヨウ素化したHA307-319アナログ1μMを、50μLの容量中、競合体としてHA307-319を含有しているかまたは含有していないPBS/1%オクテリグルコシド中で、2μMのDR4Dw4とともに一晩インキュベートした。同時に、マイクロエルプレートに、4℃で一晩LB3.1でコートし、PBS/0.05% Tween / 0.1% BSAで洗浄し、4℃にてPBS/5% FCSでブロックした。次に、50μLのPBS/1%オクテリグルコシド/5% FCSを各ウェルに添加し、次にペプチドとクラスII MHC糖タンパク質のインキュベーション混合物50μLを添加した。1時間インキュベートし

特表平6-506056 (8)

た後、プレート洗浄して計数した。

b) アミノ末端がビオチニル化された、インフルエンザ赤血球凝集素の残基307-319に相当するアグニスト (HA307-319) を、アフィニティ精製したDR4Dv4 (2 μ M) とともにPBS/1%オクテリルグルコシド中でインキュベートした。ペプチドDR複合体を、25 μ lのPBS/1%オクテリルグルコシド (5%FCS) と10 μ lのインキュベーション混合物を、抗体でコートしたエリザ (ELISA) プレートのウェルに添加したことを除いて、ヨウ素化HAと同様に、遊離ペプチドから分離した。1時間インキュベートした後、プレートをPBS/0.05% Tween /0.1% BSAで洗浄し、結合したHA307-319の量を、 125 I ストレプトアビジン (6-30 ng/ウェル) とともに4℃で1時間インキュベートし、次に、洗浄し、計数することによって定量した。

c) ビオチニル化HA307-319のDR4Dv4との結合に対する競合を、PBS/1%オクテリルグルコシド中、いくつかのHAモノ置換ペプチド (例えば309位のlys, serあるいはphe) (200 μ M) があある場合またはない場合について、上記b)と同様に行った。抗体LB3.1の場合、DR抗原存在下で観察された計数値はバックグラウンドと比べて約2倍であったが、一方非放射性競合体の存在下では、計数値はバックグラウンドより幾分低かった。抗体1VD12の場合、DRの存在下で観察された計数値はバックグラウンドより低かった。阻害曲線の代表的な結果を図1に示す。

実験b)については、放射性ペプチドとDR抗原の組合わせを除いて、実質的にシグナルは観察されなかった。

モノクローナル抗体LB3.1を、コスター (Costar) EIA-RIAプレートに、50mM トリス-HCl pH 9.0中、4℃で一晩あるいは37℃で1時間コートした。プレートを洗浄し、5% FCS/PBSを用いて室温で1時間ブロックし、次にタイターテックプレートウォッシャー (Titertek plate washer) を用いて、0.05% Tween 20/0.01%アジド/PBS (洗浄緩衝液) で3-4回洗浄した。次に、約20nMのDR MHC糖タンパク質を含有すると考えられる細胞溶解物を、上記のコートされたプレート上に4℃で4時間インキュベートした。そのプレートを、0.05% Tween 20/0.01%アジド/PBSで3-4回洗浄した。次に、ビオチニル化HAペプチド307-319を、5% FCS/1%オクテリルグルコシド (OG)/PBS中、200 μ l/ウェルで、プレートに添加し、CO₂インキュベータで37℃で一晩インキュベートした。

プレートを洗浄緩衝液で3-4回洗浄し、200 μ lのユーロビウムでキレート化したストレプトアビジン (Pharmacia/LKB Nuclear) 50ng/mlとともに4℃で4時間インキュベートした。一回追加の洗浄サイクル後、プレートを、200 μ l/ウェルの1234アルフィアサーチ (Delfia research) 蛍光光度計 (Pharmacia/LKB) での検出のために、結合ユーロビウムが放出する促進溶液 (Pharmacia/LKB) で、30分間室温で処理した。

代表的な結果を図2に示す。精製DR4 MHC糖タンパク質10nM (白丸印) あるいはDR4Dv4でトランスフェクトされたCos7細胞由来の溶解物 (白四角印) を用いて、MHC糖タンパク質を得たときと同様に、Priess細胞溶解物 (黒丸印) を使用したと

競合実験c) では、点置換 (すなわち308位でのリシンあるいはセリン) を含有するアナログに相当するペプチド競合体の場合、計数値はバックグラウンドとほぼ同じであった。一方非放射性ペプチド307-319または308位にフェニルアラニンが存在する場合、実質的に放射性は観察されなかった。

実施例4

ビオチニル化赤血球凝集素アナログのDR4Dv4

との結合に対する非放射性および放射性検出

システムの比較

検定は、HAのビオチニル化アラニンバックボーンのアナログ (AAFKAAAEAAAAA) 2 μ MおよびDR4Dv4 0.5 μ Mを用い、実施例3bに記載したのと同様に行った。ペプチドDR複合体を、蛍光性ユーロビウム結合ストレプトアビジン、西洋ワサビペルオキダーゼ結合ストレプトアビジンあるいは 125 I 結合ストレプトアビジンを用いて定量した。各々の染色試薬を滴下して、バックグラウンド最高値を超える最大シグナルを得た。

蛍光性ユーロビウムキレートで標識付けたストレプトアビジンの場合、 125 I ストレプトアビジンで見られたのと同じ大きさのシグナル/ノイズ比 (80-100:1) を観察した。西洋ワサビ・ペルオキダーゼストレプトアビジン結合体で優れたシグナル/ノイズ比 (10-20:1) をまた観察した。

実施例5

細胞溶解物中の特異的結合の検定

DRクラスII分子2 μ g/ml、200 μ l/ウェルに対して特異的な

さも、ビオチニル化HA307-319ペプチドの濃度に比例する結合曲線が得られている。対照として使用したMockトランスフェクトCos細胞 (黒四角印) は標識付きペプチドの取込みを全く示さなかった。

実施例6

相互のプレート検定法のプロトコル

この検定法は、抗体をカップリングしたプレートを調製したことを除いて実施例5に述べたのと類似の方式で以下のように実施した。

酸化された抗体をその表面に共有結合するAvid-BiotinTM プレート (Bioprobe International) を用いた。まず第1にLB3.1モノクローナル抗体を、50mM 酢酸緩衝液 pH 5で、10 μ g/mlまで希釈し、次に1/10容量の新しく調製した10mM メタ過ヨウ素酸ナトリウムを添加することによって酸化した。室温で30分後、酢酸緩衝液中、20mM エチレングリコールの1/10容量を添加することによって反応を停止させた。115 μ lの酸化抗体溶液を、Avid-BiotinTM プレートのウェルに添加し、4℃で一晩インキュベートした。次にそのプレートを洗浄液 (PBS/0.05% Tween 20/0.01% アジ化ナトリウム) で4回洗浄し、次にPBS/5% FCS/0.01% アジ化ナトリウムを用いて4℃で1時間ブロックした。

PBS/0.75% オクテリルグルコシド/0.01% アジ化ナトリウム (結合緩衝液) 中の、20nM DR4Dv4 125 μ lを各ウェルに添加し、4℃で4時間インキュベートした。プレートを洗浄緩衝液で4

回洗浄し、結合緩衝液を含有するビオチニル化 HA307-319 ペプチドの125 μ lで処理し次いで37℃で一晩インキュベートした。そのプレートを洗浄緩衝液で4回洗浄し、次いでユーロビウムでキレート化されたストレプトアビジン50ng/ml (Pharmacia/LKB)の125 μ lとともに4℃にて一晩インキュベートした。1回追加洗浄サイクル後、プレートを125 μ l/ウェルの促進溶液 (Pharmacia/LKB)で室温にて1時間処理し、1234デルフィア リサーチ (Delfia research) 蛍光光度計で読取った。

実施例5と類似の結果を得た。

実施例7

前負荷されたMHC糖タンパク質の使用

適切な前負荷するペプチドを決定するためにオフ速度をいくつかの候補の前負荷するペプチド: すなわちBPFENIVTPRTPAの配列を有するラットのミエリン塩基性タンパク質90-102 (RMBP90-102): RRPAAAYAAARAAAの配列を有するHA由来タンパク質3.2 (HADP3.2): およびRRPAAQYAAARAAAの配列を有するHA由来タンパク質3.6 (HADP3.6)について測定した。標識付けた前負荷するペプチド50nMを、PBS pH 7.0結合緩衝液中、400nMのDR4Dv4とともに48時間インキュベートした。複合体を、PBSで1:40に希釈し、および未標識のHA307-319の種々の濃度を、種々の倍率に希釈し、次に上述のようにLB3.1をカップリングさせた抗体プレートに、複合体を捕捉させることによって測定した。図3A~3Cに示すように、どの試験ペプチドも、オフ速度がHA307-319の存在によって影響を受けることを示さず、RMB

P90-102の解離速度は上記3つの中で最も速かった。従って、この検定に用いるために、RMBP90-102による前負荷を選択した。

この検定では、2 μ Mの精製DR4Dv4と1 μ MのRMBP90-102を、上述のようにPBS/0.75% オクチルグルコシド/0.01% アジ化ナトリウムの結合緩衝液中で一晩インキュベートした。

抗体捕捉プレートは、115 μ lの2 μ g/ml LB3.1を用いて4℃にて一晩で調整し、洗浄し、上述のようにブロックした。

前負荷された複合体 (すなわちDR4Dv4/RMBP90-102) を1:100に希釈し、種々の濃度のビオチニル化 RMBP90-102あるいは8.8nMのビオチニル化 RMBP90-102とともに、種々の量の未標識の同じペプチドの存在下でインキュベートした。対照として用いる、希釈された前負荷されていないDR MHC糖タンパク質もまた同様に処理した。

反応混合物の一部 (50 μ l) を捕捉プレートに移し、4℃で4~24時間インキュベートした。そのプレートを上述したように洗浄し、次に、検定緩衝液 (カルシウムとマグネシウムを含有しないPBS+0.5%BSA、0.1%アジ化ナトリウム中20 μ Mのジエチレントリアミンペンタ酢酸 (DTPA)) 中、60ng/mlユーロビウム-ストレプトアビジンの125 μ lで処理し、4℃で2~24時間インキュベートした。追加の洗浄を行った後、プレートを上述のように増強して読み取った。

代表的な結果を図4Aと4Bに示す。図4Aは、対照としてのビオチニル化RMBPと、前負荷されたDRの結合曲線を示す。図4B

は、未標識RMBPの種々の濃度を用いて得た阻害百分率を示す。上述のように、結果は、前負荷されたDR MHC糖タンパク質と前負荷されていないDR MHC糖タンパク質について類似している。試薬を滴下した後、0.1MH₂PO₄でpHを6.5に調節されたカルシウムとマグネシウムを含有していないPBS中、37℃で一晩インキュベートすることによって、2 μ M DR4Dv4に250nM RMBP90-102を前負荷して、スクリーンがなされることを測定した。前形成された複合体は、1/40に希釈し、標識付けたアゴニストと試験化合物を3時間反応させた。このようにして複合体を上述のように捕捉した。

実施例8

リガンド/受容体の解離速度の検出

リガンド/受容体の解離速度が、存在する複合体の濃度のみ依存している場合は、一次反応である。クラスII/ペプチドの解離速度を研究すると、その反応はいくつかの場合では一次反応であるが、すべてが一次反応ではない。

解離速度を測定するために、400~500nMのDR4Dv4を、50nMビオチニル化RMBPあるいは25 μ Mのビオチニル化HSP (マイコバクテリウム・ツベルクロシス (Mycobacterium tuberculosis) 由来の19KDの熱ショックタンパク質3-14) とともに、先に述べたように、37℃で一晩インキュベートした。これらの前形成された複合体は、次に、HA307-319の濃度を変えるか、あるいは変えることなく緩衝液で100倍に希釈した。図5Aに見られるように、RMBPの解離速度は第2のペプチドによって影

響されない。しかし、図5Bに見られるように、HSPの解離は他のペプチドの存在によって加速し、その解離速度は、他のペプチドの濃度にもなって増加するのでこの解離は明らかに一次反応ではない。

これは置換モデルを示唆し、この場合第2ペプチドは第1ペプチドを押し出す。従って、第2の前負荷されるスクリーニング検定では、800nMのDR4Dv4と6 μ Mのビオチニル化HSP3-14を上述のようにインキュベートした。複合体を、競合体の候補的部分を含有するか、あるいは含有していない緩衝液で40倍に希釈して、置換を30分間、計数値の減少によって測定した。図5はペプチド競合体(RMBP)による置換を示しているが、どんな小さな分子も潜在的に同じ作用を持っている。

実施例9

感作されたT細胞増殖による検出

HA307-319に対して特異的に反応性のT細胞クローンを、B LAクラスIIに表現型のDR4Dv4、DR7、DRv53、DQv6、DQv9を有する固体から調製した (実施例1に記載されているように行った)。簡単に述べると、末梢血液の単核細胞を、ストレプトマイシン (100 μ g/ml)、ペニシリン (100U/ml) および5%のブールしたAB血清 (Whittaker Fredricksburg, MD) を補足したRPMIで、1/100に希釈したインフルエンザワクチン (Parke Davis) を用い、インビトロで感作させた。5%CO₂中5日間37℃でインキュベートした後、T細胞の細胞芽を、mlあたり10⁶の同種異系 PBMC (30Gy照射)、B細胞に形質転換されたオートログ

スEBVの 10^5 細胞(50Gy照射)。インフルエンザウィルスワクチンの1/100希釈、および $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のロイコアググチニン-A(Pharmacia社)を含有する、フィーグー混合物の存在下、3ウェルあたり1細胞に希釈を制限することによってクローンした。懸濁液を、96ウェルの平底微量滴定プレートにプレートし、上述したようにインキュベートした。増殖培養物を24-ウェルの組織培養プレートに移し、同じフィーグー混合物で再刺激した。3日後、10% IL-2を添加し、細胞を凍結するかまたはさらに再刺激によって膨張させた。特異性をHA307-319で測定した。

DR4Dv4糖タンパク質を、実施例1に記載されているようにして、Priess EBV-B細胞からアフィニティー精製した。簡単に述べると、該細胞はウシ胎児血清で補足したRPMI培地で増殖させて遠心分離で集め、PBSで洗浄し、1% Nonidet P-40で溶解した。細胞断片を遠心分離で取り除き、生成した溶解物を、製造者の指示にしたがって、40ngの抗体を10mlのマトリックスセルファインホルミル(Matrex Cellufine Forayl) (Amicon)にカップリングすることによって調製したモノクローナル抗体LB3.1セルロースカラムに直列接続したセファロースCL-4Bカラムへ直接負荷した。これらのカラムを、10mM トリス HCl pH7.5、150mM NaCl、0.1% デオキシコール酸の20倍容量で洗浄した。次にLB3.1セルロースカラムをカラムの5倍容量の10mM トリス HCl pH7.5、1% OGで洗浄し、50mM グリシン pH 11.5、1% OGで溶離した。得られた画分はそれぞれpH 2の2M

グリシンでpH 7.5に調節した。全画分を、10mM トリス HCl、pH 7.5 1% OGに対して透析を行い、4℃で貯蔵した。

MHC糖タンパク質/ペプチド複合体を調製するために、精製DR4Dv4を、1%OG/PBS中 HA307-319を種々の濃度で、37℃で一晩インキュベートした。50 μl の該混合物を、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のLB 3.1含有の50mM トリス HCl、pH 9中で4℃にて一晩インキュベーションして、LB3.1でコートされた96ウェルの平底エリザプレートに添加した。得られた混合物を、コートされたプレートを用いて4℃で6時間インキュベートし、次にPBSで2回および完全培地で1回洗浄した。

T細胞増殖検定のために、完全培地200 μl 中に 3×10^4 のT細胞を各ウェルに添加した(T細胞は再刺激10~11日後に使用した)。24時間インキュベーションした後、トリチウム化したチミジンをウェルあたり1.0 μCi づつ添加し、次にそのプレートをさらに18時間インキュベートした。試料を半自動式ハーベスターを用いて、ガラス繊維のフィルター上に収集し、チミジンの取り込み量を、シンチレーションカウンターで計数することによって測定した。3重反復測定の結果を図7に示した。

図7に示すように、T細胞の増殖は、試験HA307-319ペプチド結合曲線を決定するのに用い得る。

特定のMHC糖タンパク質に対する結合親和性について候補的部分をスクリーニングするための、迅速かつ効率的検定を提供することは上記の結果から明かである、したがって該方法

は候補体の広範囲の種類と、MHC糖タンパク質と相互に作用するそれらの能力とを評価でき、および結局はこのようなMHC糖タンパク質を有する宿主中の免疫応答を調節することができる。

本明細書に記載されているすべての刊行物および特許出願は、あたかもこれらの個々の各刊行物あるいは特許出願が、特定的におよび個々に参照によって取り込まれ、示されているのと同程度に、参照によって本明細書に援用される。

本発明は十分に記載されているので、多くの変更および改変を、請求の範囲の精神あるいは適用範囲から逸脱することなく行い得ることは、当業者にとって自明である。

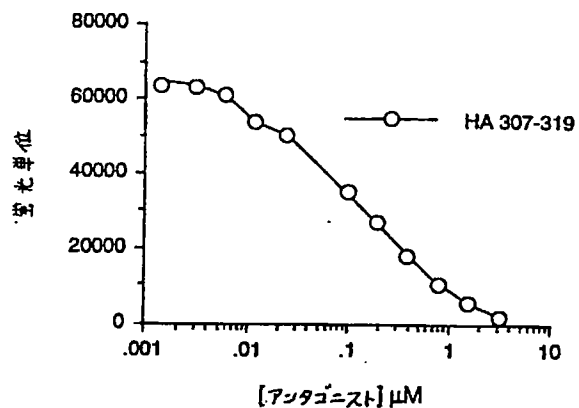


Fig. 1

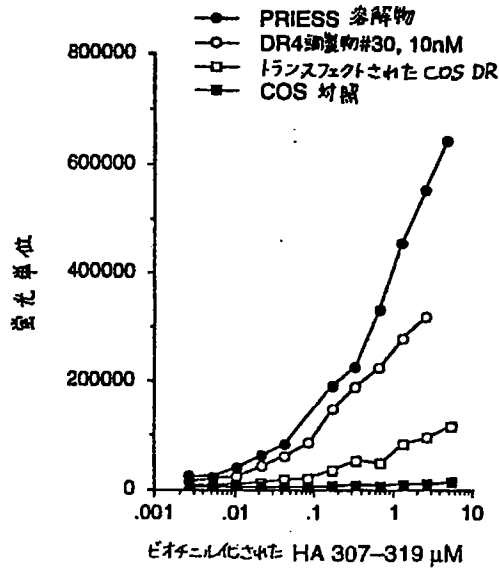


Fig. 2

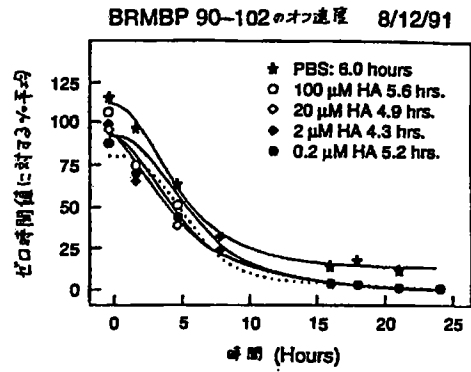


Fig. 3A

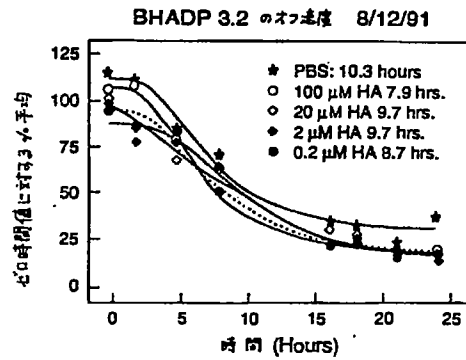


Fig. 3B

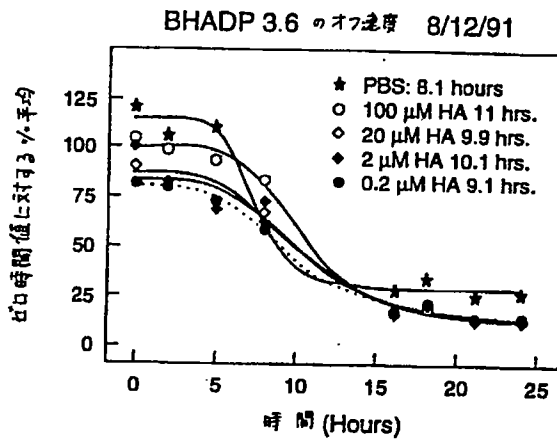


Fig. 3C

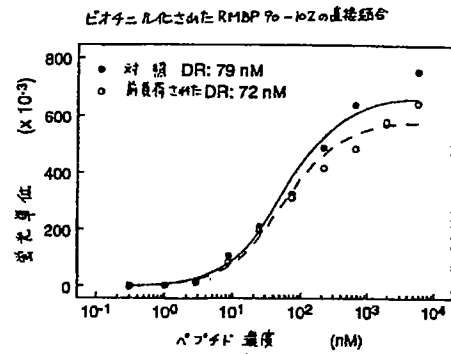


Fig. 4A

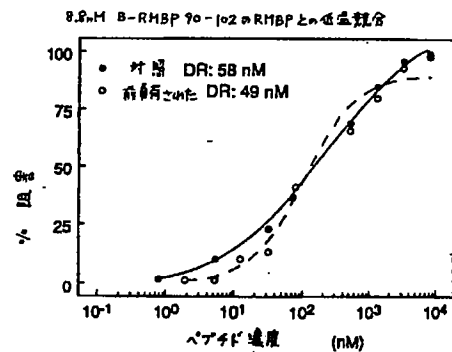


Fig. 4B

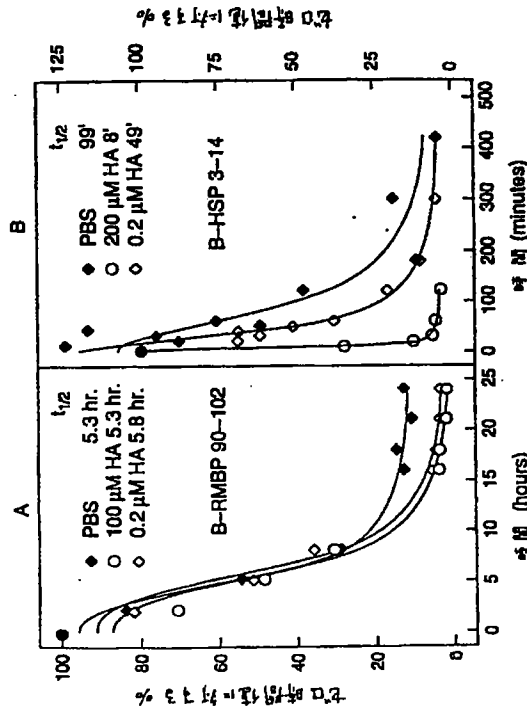


Fig. 5

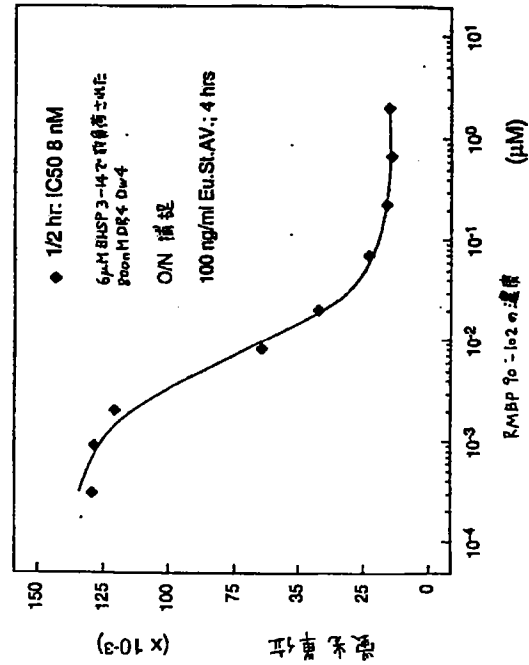


Fig. 6

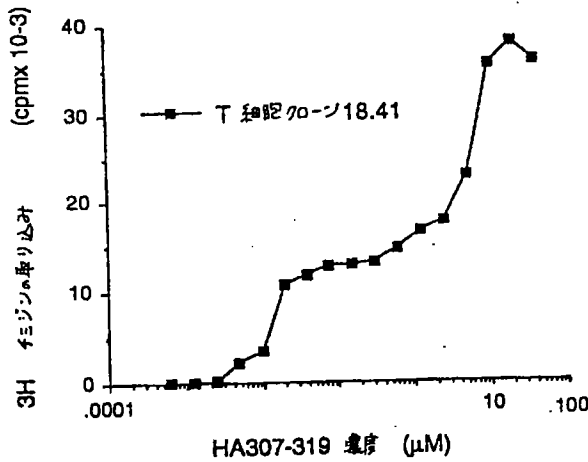


Fig. 7

国際調査報告

Interpreted Application No. **PT/89/0000**

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER OF INVENTION (inventor's name, address, and date of filing)

IPC Class. No. **G01N 33/53, 33/53, 33/53, 33/53, 33/53**

U.S. Cl. No. **435/7.21, 7.24, 7.5, 7.8, 7.9, 7.92, 29; 436/501, 503, 512, 518, 541**

2. FIELD SEARCHED

Maximum Documentation Searches?

Classification System

U.S. Cl. No. **435/7.21, 7.24, 7.5, 7.8, 7.9, 7.92, 29; 436/501, 503, 512, 518, 541**

Documents Searched other than Maximum Documentation Searches

Is the Invention Novel? (Documents are included in the Patent Document)

3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant disclosure	Relevant to Class No. 4
Y	Science, vol. 235, issued 20 February 1987, J.L. Marx, "Histochemical restriction explained", pages 843-844, See page 844, col. 3, last paragraph.	1-14 and 19
Y	Nature, vol. 328, issued 30 July 1987, A. SEITE ET AL., "Structural characteristics of an antigen required for its interaction with Ia and recognition by T-cells", pages 395-399. See legend to Table 1.	1-14 and 19
Y	Science, vol. 235, issued 13 March 1987, S. Bae et al., "The relation between major histocompatibility complex (MHC) restriction and the capacity of Ia to bind immunogenic peptides", pages 1353-1358. See legend to Table 2, para. spanning cols. 1-3 of page 1354 and para. spanning pages 1354-1355.	1-14 and 19
Y	US. A. 4,048,298 (KISSENER) 13 September 1977, see col. 1, lines 44-65 and col. 2, lines 1-9.	7-9

Continued on extra sheet.

4. CERTIFICATION

Date of filing of the International Search Report: **11 February 1992**

Date of filing of the International Search Report: **27 FEB 1992**

Interpreting Authority: **David A. Saunders**

ISA/US

IN DOCUMENTS REFERRED TO BY REFERENCE		
EXTRACTED FROM THE SECOND SHEET		
Category	Excerpt of Document with indication, where appropriate, of the relevant passage	Referred to Class No.
Y	US. A. 4,120,945 (GUTCH ET AL.) 17 October 1978. See Abstract.	19
Y	US. A. 4,228,237 (HEVEY ET AL.) 14 October 1980. See col. 1, line 67-col. 2, line 15 and col. 3, line 60-col. 4, line 5.	5-6, 9 and 13-14
Y	US. A. 4,478,946 (VAN DER MERVE ET AL.) 23 October 1981. See col. 17, lines 23-47.	10-14

フロントページの続き

- (72) 発明者 ロスバード, ジョナサン ビー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94027
アサートン, ワトキンズ アベニュー
54
- (72) 発明者 ウィッカー, リンダ エス.
アメリカ合衆国 ニュージャージー
07076 スコッチ プレーンズ, ブルック
サイド コート 2
- (72) 発明者 キューボン, ローズ エム.
アメリカ合衆国 ニュージャージー
07023 ファンウッド, ティロットソン
ロード 5
- (72) 発明者 ニコルス, エリザベス エイ.
アメリカ合衆国 ニュージャージー
07093 ウェストフィールド, グラント
アベニュー 808

- (72) 発明者 ブッシュ, ロバート
ドイツ連邦共和国 6900 ハイデルベルク
1, イン モイエンハイマー フェルト
280, ポストファッハ 101 949, ドイ
チェス クレプスフォルシュングスツェン
トルム, インスティテュート フュア イ
ムノロジー ウント ゲネティック
- (72) 発明者 パン シューテン, ウィム
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94304
パロ アルト, ウィリアムズ ストリー
ト 2103
- (72) 発明者 ヒル, シー. マーク
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94306
パロ アルト, ルーズベルト サークル
60